

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patent Kind Lan Pg Filing Notes Application Patent
WO 9201002 A
Designated States (National): US
Designated States (Regional): BE CH DE FR GB NL SE
JP 5001100 A 7

Abstract (Basic): WO 9201002 A

A new tumour necrosis factor (TNF) inhibitor has a mol. wt. of about 34,000 and an N-terminal sequence VAL-ALA-PHE-THR-PRO-TYR-ALA-PRO-ALA-PRO-THR. It inhibits the cytotoxic effect of TNF in mouse L-929 cells (NCTC clone 929).

The new inhibitor is isolated from urine (esp. from urine of patients with febrile illnesses) by purification on an ion-exchange or reverse-phase column, followed by a TNF-fixing affinity column with selection of active fractions by their inhibition of TNF in L-929 cells.

USE - Treatment of conditions involving elevated TNF levels, such as septic shock, rheumatism, acute liver failure, DIC or burns.

Dwg.0/2

Title Terms: TNF; INHIBIT; MOLECULAR; WEIGHT; OBTAIN; CHROMATOGRAPHY; URINE
; ACTIVE; CELL; LINE

Index Terms/Additional Words: TUMOUR; NECROSIS; FACTOR; KILO; DALTONS

Derwent Class: B04

International Patent Class (Main): C07K-015/12

International Patent Class (Additional): A61K-037/02; C07K-003/20;
C07K-015/06

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B04F; B12-A07; B12-D09; B12-D10; B12-G02

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M710 M903 P220 P423 P721 P941 V600 V641

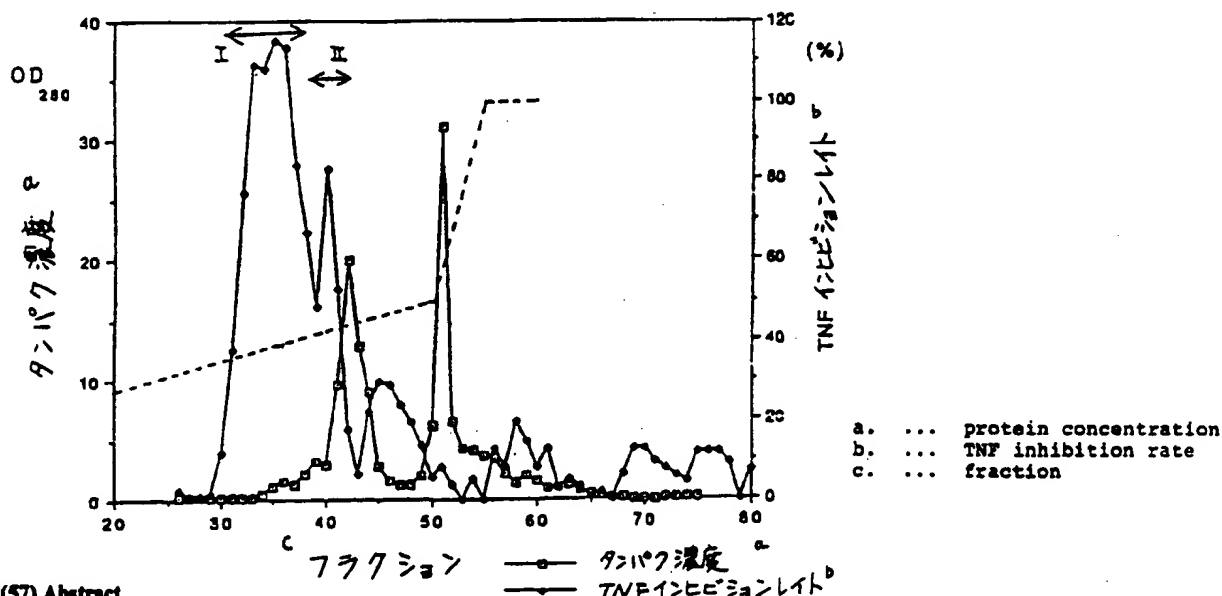


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C07K 15/06, 15/12, 3/20 A61K 37/02	A1	(11) 国際公開番号 WO 92/01002 (43) 国際公開日 1992年1月23日 (23. 01. 1992)
(21) 国際出願番号 PCT/JP91/00920 (22) 国際出願日 1991年7月10日 (10. 07. 91) (30) 優先権データ 特願平2/181488 1990年7月11日 (11. 07. 90) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 帯人株式会社 TEIJIN LIMITED (JP/JP) 〒541 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号 Osaka, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 鈴木 純 (SUZUKI, Jun) (JP/JP) 〒191 東京都日野市多摩平3-18-4-244 Tokyo, (JP) 木 貴二 (YONE, Kenji) (JP/JP) 〒191 東京都日野市多摩平3-18-4-242 Tokyo, (JP) 恒川典之 (TSUNEKAWA, Noriyuki) (JP/JP) 〒191 東京都日野市多摩平3-5-18 Tokyo, (JP) 市川弥太郎 (ICHIKAWA, Yataro) (JP/JP) 〒359 埼玉県所沢市小手指町2-11-7 Saitama, (JP) (74) 代理人 弁護士 前田純博 (MAYEDA, Sumihiro) 〒100 東京都千代田区千代田2丁目1番1号 帯人株式会社 知的財産部内 Tokyo, (JP)	(81) 指定国 BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US 添付公開書類 国際特許公告書	

(54) Title : TUMOR NECROSIS FACTOR ACTIVITY INHIBITOR AND PRODUCTION THEREOF

(54) 発明の名称 腫瘍壊死因子活性抑制物質及びその製造方法



(57) Abstract

A novel tumor necrosis factor activity inhibitor which inhibits the cytotoxic effect of a tumor necrosis factor and has a molecular weight of about 34 kDa and a sequence of 11 amino acids at the N-terminus of Val-Ala-Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Ala-Pro-Thr.

(57) 要約

本発明は腫瘍壊死因子の殺細胞効果を抑制し、分子量が約34KDaであり、N末端から1～11番目のアミノ酸がVal-Ala-Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Ala-Pro-Thrである新規腫瘍壊死因子活性抑制物質及びその製造方法である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AT オーストリア
AU オーストラリア
BB バルバードス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
CA カナダ
CF 中央アフリカ共和国
CG コンゴ
CH スイス
CI コート・ジボアール
CM カメルーン
CS チェコスロバキア
DE ドイツ
DK デンマーク

ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GI ギニア
GB イギリス
GR ギリシャ
HU ハンガリー
IT イタリア
JP 日本
KP 朝鮮民主主義人民共和国
KR 大韓民国
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ
LU ルクセンブルグ
MC モナコ
MG マダガスカル

ML マリ
MN モンゴル
MR モリタニア
MW マラウイ
NL オランダ
N ノルウェー
PL ポーランド
RO ルーマニア
SD スーダン
SE スウェーデン
SN セネガル
SU ソビエト連邦
TD チャド
TG トーゴ
US 米国

明 細 書

〈発明の名称〉

腫瘍壊死因子活性抑制物質及びその製造方法

〈技術分野〉

本発明は腫瘍壊死因子の活性を抑制しうる新しい物質、及びその物質の単離、精製に関する。

〈背景技術〉

腫瘍壊死因子 (TNF) は CD-1 Swiss マウスに *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) 菌を投与し、その2週間後に細菌内毒素 (エンドトキシン) を投与した際に血中に現われる生理活性物質として発見され、1975年に Carswell らが報告 [E. A. Carswell ら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 72, 3666 (1975)] した生理活性蛋白質で、そのアミノ酸配列は1985年に Aggarwal ら [E. B. Aggarwal ら、J. Biol. Chem. 260, 2345 (1985)] により明らかにされている。

また Pennica ら、Shirai らおよび Wang らによって、ヒト TNF のアミノ酸配列および遺伝子配列が明らかにされた [Pennica ら、Nature 312, 724 (1985); Shirai ら、Nature 313, 803 (1985); Wang ら、Science 228, 149 (1985)]。当初その抗腫瘍活性から、癌治療薬としての

開発が進められていたTNFは、最近種々の生理活性が明らかにされ、生体内での諸機能が解明されつつある。

例えば、細菌感染によるエンドトキシンショックの生体内のメディエーターとしての活性 [B. Beutlerら、*Science*, 229, 869 (1985)]、血管内皮細胞への炎症反応の惹起 [J.R. Gambleら、*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 82, 8667 (1985)]、発熱作用 [C.A. Dinarelloら、*J. Exp. Med.*, 163, 1443 (1986)]、炎症の起因物質のひとつであるインターリウキン1 [P.P. Nawrothら、*J. Exp. Med.*, 163, 1363] などとの関係が明らかにされつつある。

また、ある種の病気の患者の体液中にはTNFが通常より多く含まれており、そのTNFの含有量とその患者の病態には深い関係があることが明らかになりつつある。すなわち、TNFの過剰産生により、病態の悪化が生じていると考えられる疾患が多く存在する。このような疾患に対して、抗TNF作用を有する物質を投与することにより、病態の改善が行なえうことは、容易に推察ができる。事実、エンドトキシンショックに対しては、抗TNF作用を有する物質として、抗TNF抗体の投与が、動物を用いて行なわれ、顕著な効果を示したことが報告されている [B. Beutlerら、*Science*, 229, 869 (1985)]。しかし、現在のところ、抗TNF抗体はヒト以外の動物由来のものしか作成されておらず人体に対する投与には

このような抗体では大きな問題があると考えられる。さらに、TNFが関与していると考えられる急性、慢性の炎症反応においては、免疫複合体の形成が、少なくとも病状を悪化させる要因のひとつであることが広く知られており、このような疾患に対して、抗TNF作用を有する物質として、抗TNF抗体を治療のために用いることは難しいと考えられる。そこで、ヒトの体液中に天然に存在しうる抗TNF作用物質を用いることができれば、TNFが関与している疾患に対して、充分、有効かつ安全な治療薬として使用しうるものであると推察されるようになった。

かかるTNF活性抑制物質（TNFインヒビターともいう）に関しては、C. Peetreら[Eur. J. Haematol. 41, 414 (1988), 42, 270 (1989)]、P. Seckingerら[J. Exp. Med. 167, 1551 (1988), J. Biol. Chem. 264, 11966 (1989)]及び、H. Engelmannら[J. Biol. Chem. 264, 11974 (1989)]により、尿から精製が行なわれたことが報告されている。これらの物質はそのN末端アミノ酸配列と、その後、アミノ酸配列が決定されたTNFリセプター[T. J. Schallら、Cell 61, 361 (1990), H. Loetscherら、Cell 61, 351 (1990)]のアミノ酸配列とが一致し、TNFリセプターの一部が切断されて尿中に存在したものであろうと考えられている。

また、H. Engelmannらは特定のN末端配列を有する分

分子量約3万の2つの物質を尿より単離している (H. Engelmann et al, J. Biol. Chem. 265, 1531 (1990))。また、C.A. Smithらも、かかる物質についてそのアミノ酸配列を開示している (C.A. Smith et al, Science 248, 1019, 1990)。

そこで本発明者は、新規なTNF活性抑制物質を探索すべく、研究を進めた結果、本発明に到達した。

〈発明の目的〉

本発明は新規なTNF活性抑制物質、それを含有する組成物及び該物質の製造方法を提供することを目的とする。

〈発明の開示〉

本発明は下記発明を包含する。すなわち本発明は、

- (1) 腫瘍壊死因子のL929細胞への殺細胞効果を抑制し、
- (2) SDS-PAGEにおける分子量が還元状態で34 K \pm 1 KDaであり、

- (3) N末端から1～11番目までのアミノ酸が次の配列

Val-Ala-Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Ala-Pro-Thr

で表わされる物質である

本発明の物質は、N末端から11番目のアミノ酸がVal-Ala-Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Ala-Pro-Thrであることを特徴とする。

本発明の物質は、C. Peetre ら [Eur. J. Haematol. 41, 414 (1988)] 記載の物質とは、その分子量において、彼等の報告しているものが約 50 KDa、本発明の物質が 34 KDa という点で相違する。

また、P. Seckinger ら [J. Exp. Med. 167, 1551 (1988), J. Biol. Chem. 264, 11966 (1989)] に記載されている物質とは、SDS-PAGE における分子量はほぼ等しいものである。しかし、最終精製に用いている逆相カラムからの溶出アセトニトリル濃度が、カラムが異なるという条件を考慮しても、大きく異なるという点で相違する。

また、H. Engelmann ら [J. Biol. Chem. 264, 11974 (1989)] に記載されている物質とは、その分子量及び N 末端からのアミノ酸配列に全く相同性がないという点で異なる。

また、H. Engelmann ら [J. Biol. Chem. 265, 1531, 1990] に記載されている物質 TBP I とは、N 末端からのアミノ酸配列が全く異なる。

また、TBP II とは、彼らが報告しているような N 末端アミノ酸の多様性が認められず、かつ、分子量も若干異なる。

本発明において TNF とは、Aggarwal ら [J. Biol. Chem. 260, 2345 (1985)] や Shirai ら [Nature 313, 803 (1985)] により報告されている TNF- α であり、

天然TNF及びリコンビナントTNFを含む。

本発明において、L929細胞とは、マウスfibrosarcoma由来の樹立細胞株であり、ATCC株番号はCCL-1、名称L929 (NCTC clone 929)として登録されている細胞である。

本発明の物質の分子量は、SDS-PAGEにおける分子量が還元状態で34K=1KDaの物質である。ここでSDS-PAGEにおける還元状態とは、SDSホリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行なう以前に、サンプルを適当な還元剤、例えば、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール等の存在下にて、100℃、数分間の処理を行なって、タンパク中のジスルフィド結合を開裂させた後、電気泳動を行なうことをいう。

本発明は、該腫瘍壊死因子活性抑制物質を含有する組成物を包含する。

本発明の物質は尿を精製することにより得ることができる。特に、膜性増殖性糸球体腎炎患者の尿を精製することにより得ることができる。

膜性増殖性糸球体腎炎は、臨床的には、腎糸球体への免疫複合体の沈着が認められ、さらに血中補体価の低下、糸球体基底膜の肥厚、メサングウム細胞の増殖等が認められる腎疾患である。本症発症原因はいまだ不明であるが、最近、メサングウム細胞増殖型腎炎にはサイトカイン類、特にインターロイキン6の関与が示唆されている。

[実験医学2, 11 (1989)]。インターロイキン6の産生は、TNFやインターロイキン1によって誘導されることが、多くの細胞で報告されており[実験医学2, 21 (1989), 現代免疫学93 (1988)]本疾患においてもTNFの産生亢進がおこっていることが推測される。

本発明者は、種々の腎疾患患者の血中TNF含量を測定したところ、膜性増殖性糸球体腎炎患者血中に高濃度のTNFが含有されていることを明らかとした。さらに、本疾患患者尿を用いて、TNFの活性抑制能を検討したところ、高いTNF活性抑制能があることを見出したものである。

精製はイオン交換、逆相カラム、TNF固定化カラム等の精製操作を組み合わせるにより行なうことができる。

すなわち本発明は、腫瘍壊死因子活性抑制物質の製造方法であって、

- (a) 尿をイオン交換カラム及び又は逆相カラムへの吸着及び溶出によって精製し、
- (b) 腫瘍壊死因子固定化カラムへの吸着及び溶出によって腫瘍壊死因子に結合する画分を分取し、
- (c) 腫瘍壊死因子のL929細胞への殺細胞効果を抑制する画分を選択する

ことからなる製造方法を包含する

以下、本発明を詳述する。

検体尿の調製

尿は、初尿、蓄尿、スポット尿のいずれを用いてもかまわない。好ましくは、後に、バイオアッセイを行なうために、できるだけ無菌もしくは無菌に近い状態で採取されたものがよい。採取した尿は、すみやかに冷凍保存し、使用直前に融解して用いることが望ましい。カビや細菌の繁殖を抑えるために、 NaN_3 や抗生物質、また、プロテアーゼによる分解を防ぐためにプロテアーゼインヒビター等を、尿採取直後に添加してもかまわないが、尿採取後、速やかに冷凍保存に移行すればこれらの添加物は不要である。それらの添加物を添加した場合には、適当な操作、例えば、透析、限外濾過、ゲル濾過等の操作により、バイオアッセイを行なう前に充分、添加物を除去する必要がある。

検体尿からの精製

精製は、通常のタンパク質の精製法に従って行なえばよい。尿原液では、通常、低い活性しか認められないので、まず濃縮を行なうことが好ましい。濃縮法としては、限外濾過、凍結乾燥、塩析等の通常の生化学実験法に基づいて行なえばよいが、限外濾過、塩析等を行なう場合には、目的とする物質の分子量や、沈殿を開始する塩濃度等をあらかじめ調べておく必要がある。

濃縮後は、適当な精製操作、例えばイオン交換、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィー、等電点電気

泳動、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等を組み合わせて、精製を進めることができる。

本発明の物質は、上記濃縮操作の後、TNFがカップリングしたカラムに吸着させることにより分離精製を行ない、その後、逆相カラムによる溶出により特定のアセトニトリル濃度の画分中に含まれる物質である。アセトニトリル濃度は使用するカラム、アセトニトリル濃度勾配によって異なるが、Protein C4, VYDAC社、0.46×25cmを使用し、150 分間の18～37%のアセトニトリル直線勾配を行なった場合はアセトニトリル濃度27～28%のものである。

TNF 活性抑制能の測定

TNF 活性の抑制能の測定法としては、既に知られているTNF 活性の測定を行なう系に、被験サンプルを添加すればよい。すなわち、TNF のアッセイ法として知られている *in vitro* の種々の腫瘍細胞に対する殺細胞効果、細胞増殖抑制効果、脂肪細胞の脂肪酸代謝抑制効果、正常線維芽細胞の増殖促進効果やIL-6 産生誘導効果、好中球の内皮細胞への付着促進効果や、スーパーオキシド分泌促進効果、血管内皮細胞の凝固活性亢進効果、骨細胞への破骨効果、種々の細胞でのIL-1 やプロスタグランジン類の誘導効果を測定する系が利用できる。特にL929 細胞への殺細胞効果で測定することが好適である。また、*in vivo* においてもある種の癌細胞に対す

る出血壊死効果、エンドトキシンショックの誘導効果、発熱効果を測定する系を利用することができる。しかし、*in vivo*での活性や、多くの*in vitro*での活性は、TNF以外の物質でも誘導しうる反応が多くあるため、できるだけ単純で、かつ、TNF以外の物質の影響を受けない系、例えば、*in vitro*の癌細胞に対する殺細胞活性を測定する系を用いることが望ましい。

本発明の腫瘍壊死因子活性抑制物質は、各種のTNF関連疾患の治療剤として使用される。そのための医薬組成物としては、本発明の腫瘍壊死因子活性抑制物質を有効活性成分として含み、その他製薬学的に許容しうる担体を含むものであればよい。

医薬組成物を調製する場合、有効活性成分として使用する腫瘍壊死因子活性抑制物質の抗原性の低減あるいは生理活性の増強などを目的として、例えばポリエチレングリコール(PEG)、デキストラン又はポリ-D L-アラニンなどの公知のポリマーによって修飾することもできる。

医薬組成物の形態としては、注射用組成物、坐剤その他が挙げられるが、注射用組成物としては特に静注用組成物として使用するのが好ましい。

注射用組成物の場合は、本発明の腫瘍壊死因子活性抑制物質の薬学的有効量及び製薬学的に許容しうる担体の混合物であり、その中にはアミノ酸、糖類、セルロース

誘導体、ポリビニルピロリドン類、無機化合物類などの一般的に注射用組成物に添加される賦活剤を用いることもできる。それらの具体例をあげると、アミノ酸類としては、グリシン、アルギニン、アラニン及びそれらの薬学的に許容できる塩等があげられる。糖類としては、マンニトール、イノシトール、キシリトール、乳糖、グルコース等があげられる。セルロース誘導体としてはカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース等があげられる。ポリビニルピロリドン類としては分子量10,000~1,000,000のポリビニルピロリドンがあげられる。

有機酸類としては、アスコルビン酸、クエン酸類等及びそれらの塩があげられる。無機化合物類としてはリン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウムなどがある。

これら賦形剤を溶解させる液としては、注射用蒸留水、注射用生理食塩水又は注射用リンゲル液がある。

その他注射液中には、安定剤、界面活性剤、等張化剤、無痛化剤、防腐剤、緩衝剤などが必要に応じて添加される。これらの具体例を示すと、安定剤としてはピロ亜硫酸ナトリウム、L-アスコルビン酸等の抗酸化剤：EDTA、チオグリコール剤等のキレート剤等があげられる。界面活性剤としては、ポリソルベート、ポリオキシエチレン誘導体等の非イオン性界面活性剤等があげられる。

等張化剤としては塩化ナトリウム等が挙げられる。

無痛化剤としてはベンジルアルコール、キシロカイン、プロカイン等が挙げられる。

防腐剤としてはパラベン類、クロロブタノール、塩化ベンザルコニウム、チメロサル（Thimerosal）等が挙げられる。

緩衝剤としては、クエン酸、酢酸、リン酸等のナトリウム塩等が挙げられる。

〈発明の効果〉

本発明によれば腫瘍壊死因子（TNF）のL929細胞への殺細胞効果を抑制する新規な物質を提供し、TNFが関与していると考えられる疾患、例えば、エンドトキシンショックや火傷時のショック、急性肝不全、腎不全や多臓器不全、リウマチ、SLE、ベーチェット病等の多くの自己免疫疾患、臓器移植時の拒絶反応、川崎病、DIC等の凝固異常の治療、診断等に利用できる。また上記物質の効率的な製造方法を提供することが可能となった。

〈実施例〉

以下、実施例を掲げて本発明について詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

実施例 1

尿中 T N F 活性抑制物質の精製

(1) 限外濾過による濃縮

膜性増殖性糸球体腎炎患者尿（サンプル 1）29.5Q をペリコン（ミリポア社）による限外濾過で分子量 1 万以上の画分を 290 ml まで濃縮、10mM Tris pH8.0 にバッファ交換した（サンプル 2）

(2) DEAE-Sephrose カラムによる精製

濃縮尿サンプルを 10mM Tris pH8.0 にて平衡化した 4Q の DEAE-Sephrose カラムにかけた。流速 400 ml/hr にて、10mM Tris pH8.0 で洗った後、10mM Tris-100mM NaCl pH8.0 にて、溶出を行ない、400 ml ずつフラクションを集めた

各フラクションの 1 ml をセントリコン 10（アミコン社）による限外濾過で、PBS にバッファ交換した後、各フラクションの OD₂₈₀ と、L 929 細胞に対する T N F の殺細胞効果の抑制能を測定し、活性画分をブールし、ペリコンにより分子量 1 万以上の画分を濃縮し、タンパク濃度 17.8mg/ml の粗精製品 103 ml を得た（サンプル 3）

サンプル 3 の L 929 細胞に対する T N F の殺細胞効果の抑制能を測定した（表 1 に示す）

(3) 逆相カラムによる精製

次に DEAE 粗精製品（サンプル 3）10ml を、0.1% TFA（トリフルオロ酢酸）にて平衡化した逆相カラム

(Protein C 4、VYDAC社、 $2 \times 25\text{cm}$) にか、40分間のアセトニトリル16%から、40%の直線勾配で、流速 5ml/min にて溶出を行ない、 5ml フラクシオンにて、分取を行なった。この操作を9回繰り返した後、各フラクシオンを凍結乾燥した。各フラクシオンを 1ml のPBSに融解した後、同じ溶出時間のフラクシオンをブールし、 OD_{280} とL929細胞に対するTNFの殺細胞効果の抑制能を測定した。TNF活性を抑制する活性は主に2つのピーク(ピークI、ピークII)に認められた(図1に示す)。これらのL929細胞に対するTNFの殺細胞効果を表1に示す。

ピークIの画分は、この後、TNFアフィニティカラム、逆相カラムによる精製をさらに行ない、N末端アミノ酸配列を決定したところ、Asp-Ser-Val-X-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-X-Asn-Ser-Ile (Xは477 A型プロテインシーケンサーでピークが認められなかった残基)という配列が得られ、公知のTNFインヒビター、あるいはTNFリセプター断片であると推測された。[I. Olssonら、Eur. J. Haematol. 42, 270 (1989), H. Loetscherら、Cell 61, 351 (1990), T. J. Schallら、Cell 61, 361 (1990)]

(4) TNFアフィニティカラムによる精製

次に、 18ml 得られた逆相カラム粗精製品(ピークII)のうち 7ml を、 3mg のTNFがカップリングした 0.4ml

のAffi-Gel 10 (BIO-RAD 社)に通した。ここで用いた TNF は比活性 3.3×10^7 U/mg のリコンビナント TNF であり、そのアミノ酸配列は、Shiraiらの文献 [Nature 313, 803 (1985)] に記載されているものと同ーである。PBS-0.02% NaN₃ を流して、充分、非特異的吸着成分を除去した後、25mM クエン酸 100mM NaCl-0.02% NaN₃ pH2.5 により溶出を行なった。

(5) 逆相カラムによる精製

溶出直後に、溶出液 1.2 ml を 0.1 % TFA-18% アセトニトリルで平衡化した逆相カラム (Protein C4、VYDAC 社、0.46×25cm) にか、150 分間の 18% から 37% のアセトニトリル直線勾配により、溶出を行なった。アセトニトリル濃度 27~28% において、215nm の吸収でメインピークが 1 つ認められ、その画分を分取した。これを最終精製品 A とよぶ。この最終精製品 A の L929 細胞に対する TNF の殺細胞効果の抑制能を表 1 に示す。

TNF 活性抑制物質のアッセイ

TNF 活性抑制能のアッセイは、L929 細胞を用いて、TNF 活性を測定する Ruff & Gifford の系 [J. Immunol. 125, 1671 (1980)] に、TNF と同時にサンプルを添加することにより行なった。すなわち、96 ウエルプレートに 4×10^5 cells/ml の L929 細胞を、2 μ g/ml のアクチノマイシン D と混合し、100 μ l ウエルで播種、5% CO₂、37℃ にて 2 時間培養する。この細胞に限外

濾過、透析、もしくは凍結乾燥、再融解等により、バッファーをPBSに置換したサンプル50 μ lを加え、直後に2.6ng/mlのTNF溶液(比活性 3.3×10^7 U/ng)50 μ lをさらに添加し、5%CO₂, 37℃にて18時間培養を行なった。培養後、クリスタルバイオレットによる生細胞の染色を行ない、染色された細胞を0.5%SDSにて溶解し、595nmの吸光度を測定した。

得られた595nmの吸光度をもとに、TNF-Inhibition rateを算出した。TNF-Inhibition rateの算出式は、以下に示すとおりである。

TNF-Inhibition rate

$$= \frac{[OD_{595}]_{TNF+サンプル} - [OD_{595}]_{TNF}}{[OD_{595}]_{TNFなし} - [OD_{595}]_{TNF}} \times 100(\%)$$

各サンプルは1/2希釈系列によりアッセイを行ない、それぞれTNF-Inhibition rateを算出した。30%のTNF-Inhibition rateを与えるサンプルの最大希釈の逆数を1ユニット(U)と規定し、尿中TNF活性抑制物質の各精製ステップにおけるTNF抑制活性を示したものが表1である。

表 1

精製画分	活 性 (U/ml)	総液量 (ml)	総活性 (U)
尿原液 (サンプル1)	122	25400	3.1×10^6
分子量 1 万以上 濃縮画分 (サンプル2)	4120	250	1.0×10^6
DEAE粗精製活性画分 (サンプル3)	2778	90	2.5×10^5
C4逆相カラム ピーク I	1118	28	3.1×10^4
ピーク II	281	14	3.9×10^3
ピーク I → TNFアフィニティカラム → C4逆相カラム アセトニトリル 27-28%溶出画分 (最終精製品 A)	802	2.8	2.2×10^3

尿中 TNF 活性抑制物質の分子量

最終精製品 A 350 μ l を凍結乾燥し、230 μ l の PBS に再溶解した。このサンプル 9 μ l に 10 μ l の 2×SDS-PAGE サンプルバッファー (1 mM Tris-HCl pH6.8, 10 % Sucrose, 10% SDS, 0.25mg/ml ブロモフェノールブルー)、1 μ l の 2-メルカプトエタノールを加え、100℃、5分間、加熱した後、10~20% の SDS ポリアクリルアミド勾配ゲル (第一化学、SDS-PAGE PLATE 10×20) に全量をのせ、30mA 定

電流にて、120 分間、泳動を行なった。分子量マーカーとしてはB I O - R A D 社Molecular Weight Standards -Lowを用いた。電気泳動終了後、銀染色を行なった(図2にそのスケッチを示す)。サンプルをのせたレーンには、分子量 $34\text{ K} \pm 1\text{ KDa}$ のシングルバンドのみが認められ、尿中のTNF活性抑制物質は、還元状態でのSDS-PAGE上での分子量は、 $34\text{ K} \pm 1\text{ KDa}$ であることが確認された。

N末アミノ酸配列の決定

最終精製品A 1 mlを凍結乾燥にて、約100 μg まで、濃縮を行なった後、Applied Bio Systems 社製、477 A型プロテインシークエンサーで、N末アミノ酸配列の分析を行なった。

2回の分析で、N末端より11番目のアミノ酸まで、同一の配列が同定され、これは以下の配列Val-Ala-Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Ala-Pro-Thr を有していた。

〈図面の簡単な説明〉

図1は、DEAE粗精製品を逆相カラムにかけた時の溶出プロファイルである。

図2は、最終精製品Aの還元状態下におけるSDS-PAGEの結果を示したものである。

〈配列表〉

配列番号： 1

配列の長さ： 1 1

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： タンパク質

配列：

Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Ala Pro Thr

1

5

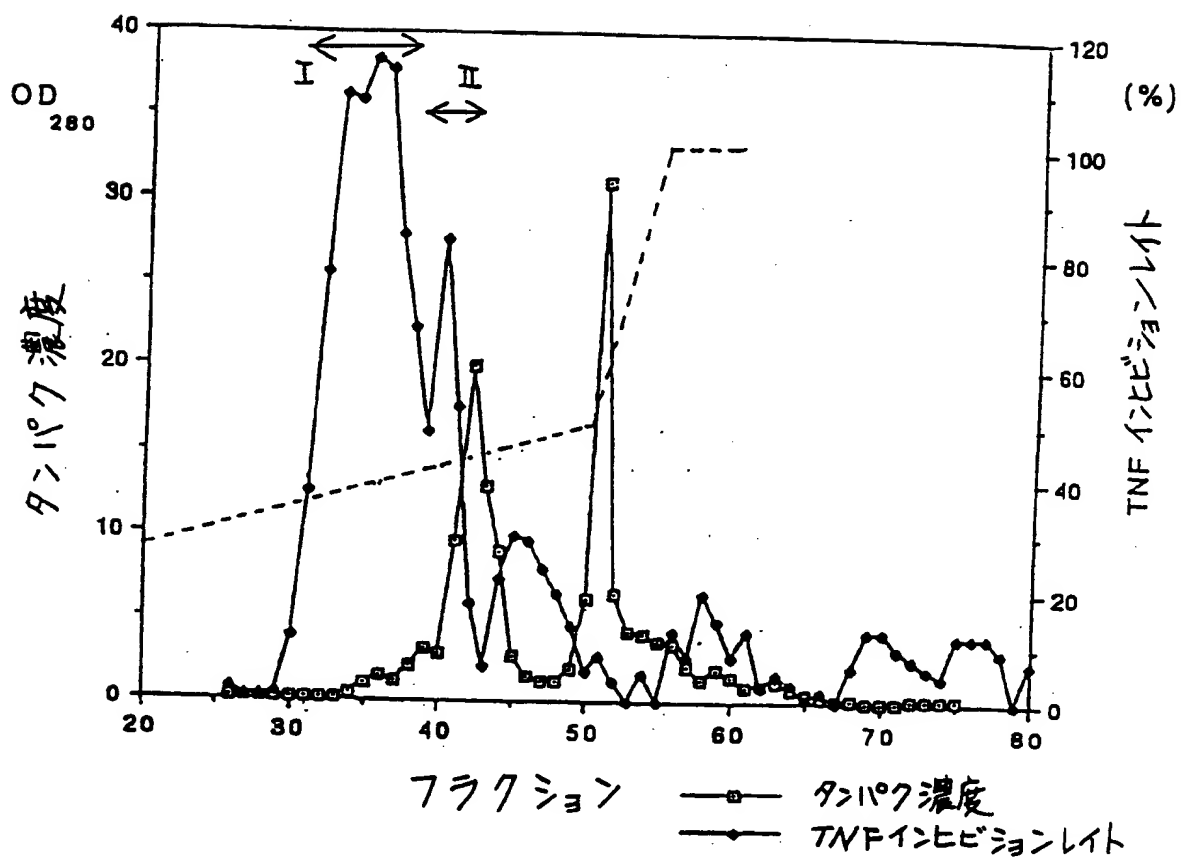
10

請求の範囲

1. (1) 腫瘍壊死因子の、L 929 細胞への殺細胞効果を抑制し、
(2) SDS-PAGEにおける分子量が還元状態で $34\text{K} \pm 1\text{KDa}$ であり、
(3) N末端から1～11番目までのアミノ酸が次の配列
Val-Ala-Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Ala-Pro-Thr
で表わされる物質。
2. 尿を精製することにより得られる請求の範囲第1項記載の物質。
3. 尿が膜性増殖性糸球体腎炎患者由来のものである請求の範囲第2項記載の物質。
4. 腫瘍壊死因子活性抑制物質の製造方法であって
(a) 尿をイオン交換カラム及び／又は逆相カラムへの吸着及び溶出によって精製し、
(b) 腫瘍壊死因子固定化カラムへの吸着及び溶出によって腫瘍壊死因子に結合する画分を分取し、
(c) 腫瘍壊死因子のL 929 細胞への殺細胞効果を抑制する画分を選択することからなる製造方法。

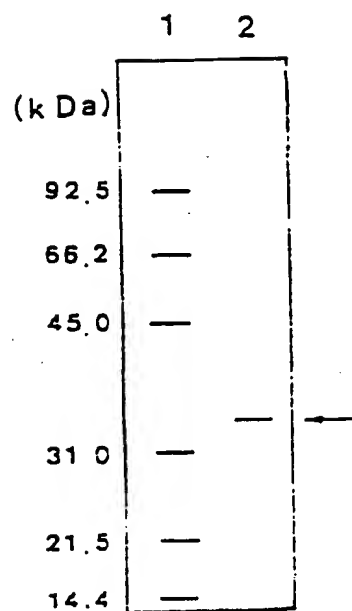
1/2

図 1



2/2

☒ 2



1: 分子量マーカー

2: サンプル

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP91/00920

I. CLASSIFICATION & SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) * According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int. Cl ⁵ C07K15/06, C07K15/12, C07K3/20, A61K37/02		
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: right; font-size: small;">Minimum Documentation Searched *</div> Classification System : <div style="text-align: right; font-size: small;">Classification Symbols</div> IPC C07K15/00, C07K3/00, A61K37/00 <div style="text-align: center; font-size: x-small;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *</div>		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ** with Indication, where appropriate, of the relevant passages **	Relevant to Claim No. **
P,A	JP, A, 3-30693 (Teijin Ltd.), February 8, 1991 (08. 02. 91), Claim, lines 12 to 17, upper right column, page 8 (Family: none)	1-4
A	JP, A, 2-117700 (Glakuso Group Ltd.), May 2, 1990 (02. 05. 90), Claim & GB, A, 2218101 & DE, A1, 3910323 & FR, A1, 2629345	1-4
P,A	WO, A1, 90/13575 (BASF AKTIENGESSELLSCHAFT), November 15, 1990 (15. 11. 90), Claim & DE, A1, 3922089	1-4
<div style="font-size: x-small;"> * Special categories of cited documents: ** "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "S" document member of the same patent family </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
September 27, 1991 (27. 09. 91)		October 14, 1991 (14. 10. 91)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
Japanese Patent Office		

国 際 調 査 報 告

国際出願 号PCT/JP 91/ 00920

I. 発明の属する分野の分類		
国際 許分類 (IPC) Int. Cl. ⁶ C07K15/06, C07K15/12, C07K3/20, A61K37/02		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C07K15/00, C07K3/00, A61K37/00	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の ファミリー	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
P, A	JP, A, 3-30693 (希人株式会社), 8. 2月, 1991 (08. 02. 91), 特許請求の範囲, 第8頁右上欄, 第12-17行 (ファミリーなし)	1-4
A	JP, A, 2-117700 (グラクソ・グループ・リミテ ド), 2. 5月, 1990 (02. 05. 90), 特許請求の範囲 & GB, A, 2218101 & DE, A1, 3910323 & FR, A1, 2629345	1-4
P, A	WO, A1, 90/13575 (BASF AKTIENGESE- LLSCHAFT), 15. 11月, 1990 (15. 11. 90), 特許請求の範囲 & DE, A1, 3922089	1-4
※引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に基礎を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 「理由を付す」 「O」口頭による開示、使用、表示等に及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の 日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出 願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解 のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新 規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の 文献との、当業者にとって自明である組合せによって進 歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリーの文献		
IV. 証 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
27. 09. 91	14.10.91	
国際調査機関	権限 する職員	4.51773.1
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	坂 中 哲 雄

THIS PAGE BLANK (USPTO)